

EPISCREEN PLUS™

Kit de diagnóstico para determinar la actividad de la alfa-glucosidasa neutra en el semen y el plasma seminal humanos.

N.º de documento: FP09 I87 R01 C.1

Actualización: 22/12/2022

Para uso diagnóstico in vitro

Reactivo para uso profesional únicamente.

INFORMACIÓN GENERAL

EpiScreen™ puede ayudar en el diagnóstico y el tratamiento de la infertilidad masculina. Este ensayo puede utilizarse para determinar la actividad de la alfa-glucosidasa neutra en el semen (plasma), una enzima secretada principalmente por el epidídimo¹.

La actividad de esta enzima es un marcador fiable de la función del epidídimo en pacientes con una concentración de esperma (muy) baja o pacientes azoospermicos que presentan un nivel de andrógenos en sangre normal:

- Una actividad muy baja indica una obstrucción bilateral entre el epidídimo y el conducto eyaculador².
- Una actividad baja refleja una obstrucción parcial del epidídimo².
- Se espera una actividad enzimática normal cuando existe una obstrucción por encima de la zona en la que se secreta la enzima o en casos de azoospermia no obstructiva (insuficiencia testicular)^{2,3}.

USO PREVISTO

EpiScreen Plus es un kit de diagnóstico fotométrico semicuantitativo y no automatizado para la detección de la alfa-glucosidasa neutra en el semen o el plasma seminal humanos y puede ser útil para el diagnóstico y el tratamiento de la infertilidad masculina.

Un kit EpiScreen Plus™ está diseñado para 25 pruebas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de la prueba se basa en la siguiente reacción:

PNPG + alfa-glucosidasa → alfa-D-glucopiranosido + PNP (amarillo)

En determinadas condiciones (pH = 6,8; T = 37 °C), 1 UI de alfa-glucosidasa libera 1 µmol de PNP por minuto del sustrato de PNPG⁵. El color amarillo del PNP puede medirse por espectrofotometría a 405 nm. La actividad de la alfa-glucosidasa se expresa en UI/l (o mUI/ml).

Nota: el tampón de reacción contiene SDS, que inhibe selectivamente la forma ácida de la alfa-glucosidasa que se origina en la próstata. Esto permite la determinación específica de actividad enzimática neutra⁴.

Nota: la varianza de fondo de las muestras de semen es bastante grande (+/-20 %), por lo que se recomienda preparar un control negativo para cada muestra de semen (plasma) utilizando la solución inhibidora. Esta solución inhibidora contiene glucosa, que inhibe la actividad de la alfa-glucosidasa⁶.

MATERIAL INCLUIDO EN EL KIT

- Reactivo 1 (5 ml): tampón de reacción (pH 6,8), complementado con SDS al 1 %
- Reactivo 2 (0,25 ml): 50x solución de sustrato (PNPG en DMSO)
- Reactivo 3 (5 ml): solución inhibidora (tampón de reacción que contiene glucosa)
- Reactivo 4 (60 ml): tampón de parada (NaOH 0,02 M)
- Reactivo 5 (1 ml): solución patrón madre (PNP 5 mM)
- Reactivo 6 (60 ml): tampón de dilución patrón (NaOH 0,02 M + SDS 0,1 %)

Certificado de análisis y fichas de datos de seguridad (FDS) de los materiales disponibles previa solicitud o descargables desde el sitio web (www.fertipro.com).

MATERIAL NECESARIO, PERO NO SUMINISTRADO

Lector de microplacas, fotómetro (filtro de 405 nm), termoagitador, bloque térmico o baño maría, pipeta con puntas nuevas, tubos Eppendorf de 1,5 ml, placa de microtitulación

MÉTODO

Escanee el código de barras (o siga el enlace en www.fertipro.com) para ver el vídeo de demostración.



MUESTRA

Deben utilizarse recipientes de recogida de semen estándar cuando el semen se recoge por masturbación. Los recipientes suelen ser de polipropileno y se ha comprobado la supervivencia y la movilidad del esperma. Deben utilizarse preservativos de plástico no tóxico para los espermatozoides cuando no es posible la recogida del semen por masturbación. Centrifugue la muestra de semen, p. ej., a 3 000 G, durante 10-15 minutos para obtener un plasma seminal sin espermatozoides.

El ensayo puede realizarse con muestras de semen fresco o congelado/descongelado y de plasma seminal.

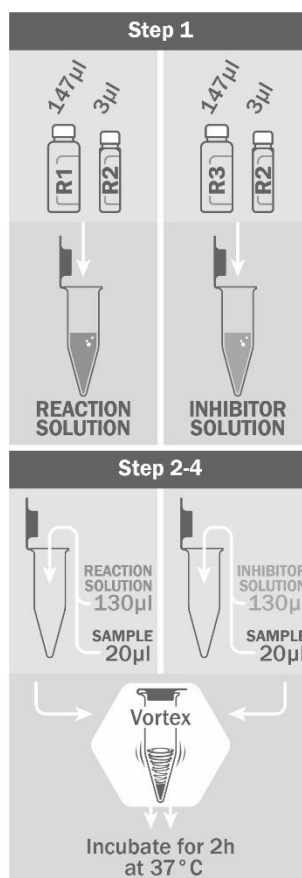
PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

No utilice el producto si el precinto de los frascos está abierto o si presenta defectos cuando se le entrega el kit.

Caliente los reactivos 1, 2 y 3 a 37 °C durante 30 minutos. (Nota: puede producirse precipitación en el Reactivo 1, pero desaparece con el calentamiento previo)

MÉTODO DE EPISCREEN PLUS

Representación gráfica del protocolo y descripción:



- Para cada muestra que semen (plasma) que se ha de analizar:

– Prepare la solución de reacción: 3 µl de Reactivo 2 (solución de sustrato) en 147 µl de Reactivo 1 (tampón de reacción)

– Prepare la solución inhibidora: 3 µl de Reactivo 2 (solución de sustrato) en 147 µl de Reactivo 3 (solución inhibidora)

- Pipetee 20 µl de cada muestra de semen (plasma) en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml.

- Añada 130 µl de la solución de reacción en uno de los tubos de reacción y 130 µl de la solución inhibidora en el otro (para el control negativo).

- Agite en un agitador vórtex e incube exactamente durante 2 h a 37 °C en un baño termostático, un termoagitador con adaptador para los tubos de reacción o un bloque térmico (evite el uso de una incubadora de aire, ya que puede afectar al resultado del ensayo).

- Durante la incubación de las muestras de semen (plasma), prepare las diluciones para la curva patrón de PNP:

- Prepare el patrón más concentrado de 200 µM: disuelva 100 µl del Reactivo 5 (solución patrón madre) en 2 400 µl de Reactivo 6 (tampón de dilución patrón). Mezcle suavemente.
- Utilice esta solución para preparar el resto de los patrones, tal y como se indica en la siguiente tabla. El Reactivo 6 por sí solo sirve como patrón 0 µM de PNP (blanco).

Diluciones patrón de PNP

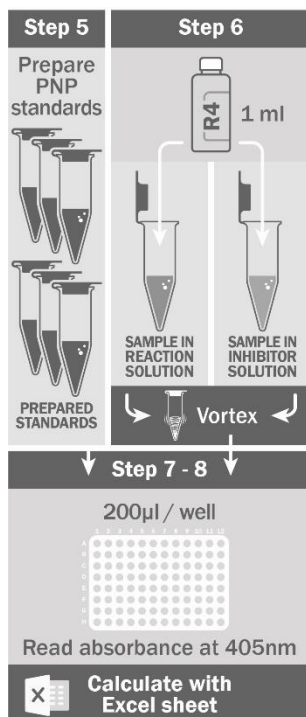
Patrones de PNP	Patrón 200 µM	Reactivo 6
200 µM	500 µl	0 µl
150 µM	375 µl	125 µl
100 µM	250 µl	250 µl
50 µM	125 µl	375 µl
10 µM	25 µl	475 µl
0 µM (= blanco)	0 µl	500 µl

- Tras las 2 h de incubación de las muestras (reacción e inhibidora), detenga la reacción: retire los tubos del bloque térmico/baño maría/termoagitador, añada 1 ml de Reactivo 4 (tampón de parada) y agite en un agitador vórtex.
- Pipetee 200 µl de todas las muestras y patrones (preparados en el paso 5) en una placa de microtitulación. Preferiblemente, realice este paso por duplicado.
- Lea la absorbancia en un fotómetro a 405 nm.
- Después de cada prueba individual deben desecharse todos los reactivos y materiales utilizados.

CÁLCULO/INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Descargue la hoja de cálculo de Excel desde nuestro sitio web e introduzca los datos en dicha hoja para calcular los resultados.

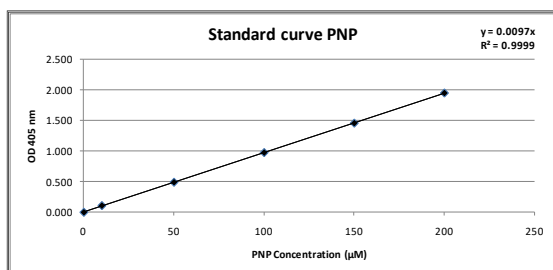


PRINCIPIO:

- Calcule la media de las lecturas duplicadas para cada uno de los patrones y muestras.
- Reste el valor de absorbancia media del blanco (patrón de 0 µM de PNP) a todas las lecturas de los patrones y las muestras. Estas son las absorbancias con corrección del blanco. En los siguientes cálculos, utilice solo los valores con corrección del blanco.
- Calcule la curva patrón de PNP (concentraciones de patrón en el eje X y los valores de DO con corrección del blanco en el eje Y). Realice la regresión lineal para calcular la pendiente. El coeficiente de determinación (R^2) debe ser $\geq 0,99$.
- Para cada muestra de reacción: reste el fondo del plasma seminal (= $DO_{\text{REACCIÓN}}$ con corrección del blanco - $DO_{\text{INHIBIDORA}}$ correspondiente con corrección del blanco). Estas son las absorbancias con corrección del fondo de sus muestras.
- Utilice la ecuación de la curva de regresión para calcular la concentración de PNP de la muestra desconocida (Concentración de PNP = valor de DO con corrección del fondo/pendiente).
- Calcule la actividad enzimática (en mUI/ml) multiplicando la concentración de PNP por 0,479 (puede encontrar más información sobre cómo se ha determinado el «factor de corrección» en las preguntas frecuentes de la página del producto de nuestro sitio web).
- Valores normales de alfa-glucosidasa neutra en semen/plasma seminal humano: $\geq 5,88$ mUI/ml

Ejemplo

Datos del ensayo y curva patrón:



Pendiente de la curva = 0,0097 (ecuación de la curva: $y = 0,0097x$), $R^2 = 0,9999$

DO del blanco (patrón de PNP 0 µM) = 0,045.

$DO_{\text{REACCIÓN}} = 0,845 \rightarrow$ con corrección del blanco: $0,845 - 0,045 = 0,800$

$DO_{\text{INHIBIDORA}} = 0,060 \rightarrow$ con corrección del blanco: $0,060 - 0,045 = 0,015$

$DO_{\text{MUESTRA CON CORRECCIÓN DEL FONDO}} = 0,800 - 0,015 = 0,785$

Concentración de PNP = $0,785/0,0097 = 80,93$ µM

Actividad enzimática por ml = $80,93$ µM x $0,479 = 38,76$ mUI/ml

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La prueba EpiScreen Plus sirve de ayuda en el diagnóstico de la infertilidad masculina y, al igual que otras pruebas biológicas, la interpretación de los resultados debe realizarse en el marco de los hallazgos clínicos y los datos de la anamnesis. Deben descartarse otras causas de secreción epididímic insuficiente, como el hipoandrogenismo o la atrofia testicular grave.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Repetibilidad y reproducibilidad: $CV_{\text{intra}} < 15 \%$, $CV_{\text{inter}} < 15 \%$

Límite de detección: 1,66 mUI/ml

Intervalo de medición: 5,02-95,8 mUI/ml

Límite: $\geq 5,88$ mUI/ml

CONSERVACIÓN/ELIMINACIÓN

- EpiScreen Plus se mantiene estable durante 24 meses a partir de la fecha de fabricación (incluso después de la apertura).
- No utilizar el producto después de la fecha de caducidad.
- Almacenar los reactivos a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- No congelar
- Mantener alejado de la luz (solar).
- Adecuado para el transporte o la exposición a corto plazo a temperaturas elevadas (hasta 5 días a 37 °C).
- Los reactivos deben eliminarse de conformidad con la normativa local para la eliminación de productos sanitarios.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todo el material orgánico humano debe considerarse como potencialmente infeccioso. Manipular todas las muestras como si fueran posibles transmisores del VIH o la hepatitis. Utilizar siempre ropa de protección al manipular las muestras y los reactivos (guantes, bata de laboratorio, protección facial/ocular). Los reactivos 1, 3 y 5 contienen azida de sodio.

Cualquier incidente grave (tal como se define en el Reglamento [UE] 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*) debe notificarse a FertiPro N.V. y, si procede, a la autoridad competente del Estado miembro de la UE en el que esté establecido el usuario o paciente.

BIBLIOGRAFÍA

- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Jöckenhovel F, and Nieschlag E. (1990) Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of alpha-glucosidase in seminal plasma. *Int. J. Androl.*, 13: 297-305
- Guerin JF, Ben Ali H, Rollet J, Souchier C, and Czyba JC. (1986) Alpha-glucosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of azoospermia. *J. Androl.*, 7: 156-162
- Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, and Comhaire FH. (1998) Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. *Hum Reprod.*, 13: 591-595.
- Paquin R, Chapdelaine P, Dubé JY, Tremblay RR (1984) Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal alpha-1,4-glucosidase. *J. Androl.*, 5: 227-282
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021
- Yao X, Mauldin R, Byers L. (2003) Multiple sugar binding sites in α -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1645: 22-29

ASISTENCIA TÉCNICA



FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem
Bélgica



EPI_PLUS

Símbolos definidos en la norma ISO 15223			
	Número de catálogo		Número de lote
	Mantener alejado de la luz (solar)		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso		Fecha de caducidad
	Diagnóstico <i>in vitro</i>		Límite de temperatura
Símbolo definido en el Reglamento (UE) n.º 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i>			
	Marcado CE por la Entidad notificada n.º 2797		